

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологий

Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись

инициалы, фамилия

« _____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 – Биохимическая физика

Каротиноид окенон как палео-индикатор режима циркуляции и динамики
уровня озера Шира.

Руководитель _____
подпись, дата

должность, ученая степень

Д. Ю. Rogozin

Студент _____
подпись, дата

Н.А. Киященко

Красноярск 2019

Содержание

Реферат	3
Введение	4
1 Литературный обзор	5
1.1 Принципы классификации озер по их трофии.....	5
1.2 Стратификация. Ежегодный температурный цикл в озерах	6
1.3 Микроорганизмы, восстанавливающие и окисляющие соединения серы	9
1.4 Фотосинтезирующие бактерии.....	10
1.5 Экология микроорганизмов, окисляющих восстановленные соединения серы.....	12
1.6 Факторы, влияющие на сохранность пигментов и каротиноидов	13
1.7 Динамика стратификации озера Шира	23
1.8 Хроматография. Жидкостная хроматография низкого и высокого давления. Схема жидкостного хроматографа высокого давления	24
1.9 Окенон	27
2 Материалы и методы исследования	29
2.1 Озеро Шира	29
2.2 Отбо проб	30
3 Результаты и их обсуждения	31
3.1 Экстракция каротиноидов	31
3.2 Современная динамика пурпурных серных бактерий в озере	34
Заключение.....	40
Список литературы	41

Реферат

Тема работы: каротиноид окенон как палео-индикатор режима циркуляции и динамики уровня озера Ши́ра.

Работа содержит 42 страницы, 7 иллюстраций, 4 таблицы, 3 формулы, 20 источников. Приложения и листы графического материала отсутствуют.

Перечень ключевых слов: *окенон, стратификация, озеро Ши́ра, каротиноид, высокоэффективная жидкостная хроматография.*

Целью данной работы является выяснение, можно ли использовать каротиноид окенон в качестве палео-маркером динамики численности пурпурных серных бактерий, содержания сероводорода и уровня воды в озере Ши́ра. В ходе выполнения данной работы было проанализировано множество проб, отобранных на экспедиционных выездах на озеро Ши́ра. В качестве метода анализа была выбрана высокоэффективная жидкостная хроматография.

В предыдущих работах было показано, что каротиноид окенон является индикатором нахождения пурпурных серных бактерий в озере. На основе этого и строится главная гипотеза данной работы. Сравнение полученных седиментационных потоков окенона с иными параметрами озера, такими как концентрации сероводорода и бактериохлорофилла, показало положительную корреляцию между этими параметрами. При росте концентрации сероводорода, повышался и поток окенона в донные отложения, и наоборот.

Сопоставление динамики уровня воды с концентрацией окенона в керне так же показало положительную корреляцию. В периоды подъема уровня воды усиливалась стратификация озера, в следствии чего увеличивалось количество пурпурных серных бактерий в водной толще, из за чего поток окенона в донные отложения резко возрастал. В периоды понижения уровня озера или долгого пребывания его на одном уровне стратификация ослабевала, в следствии чего кислород проникал глубже и численность ПСБ резко сокращалась и поток окенона уменьшался.

На основании всех полученных результатов был сделан вывод, что каротиноид окенон может служить не только в качестве чувствительного палео-индикатора наличия сероводорода в фотической зоне водной толщи, но и динамики уровня в соленых стратифицированных озерах.

Введение

Озера – это уникальные экосистемы, обладающие способностью накапливать и сохранять в своих глубинах органические и неорганические вещества. Благодаря этому становится возможно реконструировать палеоклимат всей близлежащей к озеру территории.

Уровень воды в соленых озерах отражает изменения влажности климата, поэтому актуальна реконструкция уровня таких озер по донным отложениям. Для достоверной реконструкции необходимо сопоставить состав «молодых» донных отложений с известными изменениями на озере этот же период.

Предположительно фотосинтетические пигменты серных бактерий в донных отложениях являются индикатором изменений уровня соленого меромиктического озера (Rogozin et al., 2017):

В периоды подъема уровня стратификация усиливается – увеличивается биомасса серных бактерий;

В периоды снижения уровня (либо постоянного уровня) стратификация ослабевает – уменьшается биомасса серных бактерий.

Соответственно в ответ на внешние воздействия изменяется вклад аноксигенных серных бактерий в донные отложения озера. Индикатором пурпурных серных бактерий в озере Шира является каротиноид окенон (Зыков, Рогозин, Калугин, Дарьин, & Дегерменджи, 2012). Следовательно – можно предположить, что количество окенона в донных отложениях отражает характер циркуляции озера в те или иные периоды в прошлом.

Целью данной работы является выяснение, может ли каротиноид окенон служить палео-маркером динамики численности пурпурных серных бактерий и содержания сероводорода в озере Шира.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1) Сопоставить динамику седиментационного потока окенона в осадочном материале с динамикой численности пурпурных серных бактерий, содержания бактериохлорофилла-а и сероводорода в озере Шира за период 2012-2018.

2) Сопоставить профиль окенона в донных отложениях с динамикой уровня озера за последние 100 лет и выявить возможную связь между изменением уровня и содержанием окенона.

1. Литературный обзор

1.1. Принципы классификации озер по их трофии

Классификация озер – одна из наиболее сложных теоретических проблем озероведения. Известно, что классификация – это логическая операция, состоящая из в разделении множества изучаемых объектов на классы. Классификационная деятельность включает в себя две основные задачи: построение классов, предназначенных для описания объектов или признаков; диагностирование, то есть отнесение объекта к тому или иному классу. (Мякишева, 2009)

Классификация озер по степени их трофии была предложена Тинеманном и Науманном и основывалась на наблюдениях динамики кислорода в гипolimнионе в периоды температурной стратификации, на наличии индикаторных организмов и интенсивности развития фитопланктона. (Горленко, Дубинина, & Кузнецов, 1977)

Озера, богатые биогенными элементами с дефицитом кислорода в гипolimнионе и обильным развитием фитопланктона, были названы евтрофными, на бедные – олиготрофными. Озера, вода в которых содержит большое количество темноокрашенных органических веществ, были отнесены к дистрофному типу.

По мере накопления наших познаний об озерах трудности их классификации возрастали все больше и больше. Было обнаружено чрезвычайное разнообразие переходных форм между евтрофными и олиготрофными озерами, что было невозможно выразить в каких-либо количественных показателях. Поэтому справедливо мнение Родэ, что понятие «олиготрофия» и «евтрофия» имеет смысл оставить не как основу классификации, а как общее понятия, характеризующие озеро в смысле богатства населения и специфики солевого состава. (Горленко, Дубинина, & Кузнецов, 1977)

1.2. Стратификация. Ежегодный температурный цикл в озерах

В некоторых озерах, особенно в мелководных или подверженных воздействию сильных ветров, вообще отсутствует заметная стратификация воды. Это означает, что водные массы более или менее постоянно перемешиваются под действием ветра и довольно однородны по всем параметрам. Однако для большинства глубоких озер и тех, которые находятся в ветровой тени, характерна отчетливая стратификация водной толщи по физическим свойствам, в результате которого менее плотные воды располагаются над более плотными. Такая стратификация существенно отражается на химическом составе и биологии озер. (Boehrer & Schultze, 2008)

При взаимодействии солнечной энергии с водой последняя приобретает уникальное свойство: ее плотность достигает максимальной величины при температуре ок. 4° С, постепенно уменьшаясь как при повышении, так и при понижении температуры. В озерах солнечный свет используется растениями для фотосинтеза, а животными - чтобы видеть под водой. Свет влияет также на вертикальные миграции некоторых организмов, но главный результат воздействия солнечной энергии - нагревание воды. Приток энергии от Солнца значителен. Приход солнечной энергии в течение одного летнего дня может достигать 500 кал на 1 см² поверхности озера. Часть этой энергии отражается от зеркала озера, часть рассеивается водной поверхностью в пространство, а часть поглощается водой и превращается в тепловую энергию. Эта тепловая энергия частично излучается вновь в атмосферу или затрачивается на испарение. (Boehrer & Schultze, 2008)

Нагревается главным образом верхний слой воды толщиной несколько метров, поскольку радиация быстро поглощается по мере ее проникновения вглубь. Нагревание приводит к расширению воды в этом верхнем слое, отчего ее плотность уменьшается по сравнению с плотностью нижележащих холодных слоев. Нагретая вода скапливается поверх холодных и потому более плотных вод. Однако ранней весной, особенно в районах с умеренным климатом, температура воды в целом остается низкой, так что уменьшение плотности, обусловленное таким нагреванием, незначительно, и ветер перемешивает нагретую воду во всей ее толще. Позже, по мере возрастания прихода солнечной энергии, температура воды в озере в целом повышается, и снижение плотности на единицу приращения температуры становится больше, равно как увеличивается и объем нагретого приповерхностного слоя воды. В конечном счете ветер уже не способен перемешивать всю водную массу, и приход солнечной энергии сосредоточивается в нескольких верхних метрах воды.

В результате озерные воды оказываются разделенными на два горизонта: верхний, менее плотный, теплый - эпилимнион, и нижний, более плотный,

холодный - гипolimнион. Промежуточный слой, в котором происходит быстрое понижение температуры с глубиной, называется металимнионом, или термоклинном. Такая стратификация определяется скорее плотностью воды, чем ее температурой. Поскольку в тропических регионах, где температура воды в целом выше, изменения плотности намного больше и разность температур между эпилимнионом и гипolimнионом может быть значительно меньше, чем в районах с умеренным климатом. В любом случае, если плотность воды в эпилимнионе и гипolimнионе различается на величину от 1 до 3 кг/м³, достигается заметная устойчивая стратификация. Столь небольшие различия позволяют озерным водам противостоять перемешиванию даже под воздействием сильных ветров.

В конце лета, когда дни становятся короче, а поступление солнечной радиации уменьшается, верхний слой воды остывает, становится плотнее и вскоре вместе с нижележащими водами подвергается ветровому перемешиванию, из-за чего мощность эпилимниона увеличивается. Этот процесс продолжается до тех пор, пока температура воды по всей глубине озера в результате перемешивания не сравняется с температурой гипolimниона или не станет близкой к ней. (Boehrer & Schultze, 2008)

В тропических районах, где температуры постоянно выше 0° С, такого рода циркуляция озерных вод может продолжаться на протяжении всей зимы. Однако там, где зимние температуры воздуха опускаются ниже 0° С, озерные воды продолжают остывать и перемешиваться до установления температуры 4° С. Если в дальнейшем поверхностные воды охлаждаются ниже этой температуры, соответствующей максимальной плотности воды, они вновь становятся легче и остаются на поверхности, создавая в озере стратификацию, которая не только зависит от плотности, но и связана обратной зависимостью с температурой. Скопление льдом водной поверхности оказывает стабилизирующее воздействие, и такая стратификация сохраняется на протяжении всей зимы, пока весной вновь не произойдет полное перемешивание озерных вод. Таким образом, обычно в годовом цикле озер выделяются периоды летней и зимней стратификации и весеннего и осеннего перемешивания озерных вод. (Boehrer & Schultze, 2008)

В большинстве озер в зависимости от климатических особенностей региона стратификация устанавливается один или два раза в год или же вообще не устанавливается на более или менее заметный срок. Однако стратификация других озер сохраняется постоянно, обычно вследствие того, что плотность глубинных вод повышается не за счет температурных различий, а скорее из-за более высокой концентрации растворенных химических соединений. Такие озера, в отличие от периодически полностью перемешиваемых, называются частично перемешиваемыми, поскольку в нижнем слое перемешивание не происходит. Такой же слой может существовать в очень глубоких озерах, как,

например, Танганьика, где сезонная динамика температур воздуха протекает столь быстро, что вода в озере не успевает полностью перемешаться.

Свойство озер накапливать тепло в течение лета и отдавать его зимой может оказывать существенное смягчающее воздействие на местный климат. Это особенно справедливо для крупных озер, таких как Великие. Например, оз. Мичиган ежегодно поглощает и затем отдает более 50 ккал тепла на 1 см² своей поверхности. (Boehrer & Schultze, 2008)

Для неглубоких озер, с глубиной меньше 3 метров стратификация редко бывает устойчивой в следствии однородного прогревания водной толщи. Исключение составляют соленые озера. Весной, во время таянья льда, верхний слой опресняется, в следствии чего возникает временно устойчивая стратификация. (Горбунов, 2007)

Так же одной из возможных причин устойчивости неглубоких озер может стать их высокая продуктивность. При высокой продуктивности повышается мутность, в результате чего вся световая энергия, поступающая в водоем, поглощается относительно узким приповерхностным слоем, который быстро прогревается. В то же время, защищенность многих озер высокими берегами или окружающей растительностью спасает озеро от перемешивания ветром. (Горбунов, 2007)

1.3. Микроорганизмы, восстанавливающие и окисляющие соединения серы

Процессы круговорота серы теснейшим образом связаны с продукцией и деструкцией органических веществ. В аэробной зоне водоема, в воде или в поверхностном слое иловых отложений происходит первичный синтез органического вещества фитопланктоном, фитобентосом и высшими водными растениями. Эти фотосинтезирующие организмы, осуществляющие аэробный тип фотосинтеза, для биосинтеза используют сульфаты. Также сульфат могут употреблять бактерии и другие нефотосинтезирующие микроорганизмы. Таким образом, в аэробной зоне водоема основным процессом вовлечения минеральных окисленных соединений серы в круговорот является ассимиляторная сульфатредукция. Отмирая, тела фототрофных организмов и бактерий подвергаются деструкции. При наличии кислорода серосодержащие аминокислоты чаще целиком включаются в биосинтез сапрофитных бактерий, без предварительной минерализации. В анаэробной зоне происходит разрушение этих соединений гнилостными микроорганизмами и высвобождение серы в виде свободного сероводорода. Однако главной причиной обогащения естественных вод сероводородом является сульфатредуцирующие бактерии. Они ведут диссимиляторный процесс редукции сульфатов, используя кислород сульфатов как конечный акцептор в цепи переноса электронов. (Горленко, Дубинина, & Кузнецов, 1977)

Поэтому энергетический тип обмена у сульфатредуцирующих бактерий часто называют «сульфатным дыханием». Геохимическая роль таких бактерий чрезвычайно велика, поскольку благодаря их деятельности инертное соединение – сульфат – в анаэробной зоне в больших масштабах вовлекается в биологический круговорот серы.

Сероводород могут образовывать также представители другой физической группы микроорганизмов – бактерии, использующие молекулярную серу как акцептор электронов. Правда масштабы деятельности таких бактерий в природе еще не ясны. (Горленко, Дубинина, & Кузнецов, 1977)

В случае, если зона, содержащая сероводород, освещена, его основными потребителями станут фотосинтезирующие бактерии. В мелководных водоемах этот процесс сосредоточен на поверхности иловых отложений, тогда как в стратифицированных озерах – в толще воды на верхней границе распространения сероводорода, часто совпадающей с термоклином и хемоклином. В микроаэрофильных условиях сероводород используется литотрофными тионовыми и бесцветными серобактериями. Благодаря деятельности этих микроорганизмов, а также фотосинтезирующих бактерий сероводород вновь превращается в сульфат, и серный цикл замыкается. (Горленко, Дубинина, & Кузнецов, 1977)

1.4. Фотосинтезирующие бактерии

К фотосинтезирующим или фототрофным бактериям относят прокариотные микроорганизмы, пурпурные или зеленые бактерии, осуществляющие анаэробный фотосинтез, идущий без выделения молекулярного кислорода. (Нетрусов А.И., 2006)

Фотосинтезирующие бактерии обладают зелеными пигментами, относящимися к бактериохлорофилам a, b, c, d или e, отличными от хлорофилла цианобактерий и зеленых растений, и красными или коричневыми каротиноидами. В качестве донора водорода при фотосинтезе бактерии не могут использовать воду. Для этой цели им служат восстановленные соединения серы: H_2S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^{2-} , S^0 , молекулярный водород, а для некоторых видов – органические соединения. Энергия, запасаемая в результате фотофосфорилирования, идет на биосинтез компонентов клетки из CO_2 или же органических веществ. Потребление органических соединений связано с реакциями цикла трикарбоновых кислот и иногда глиоксилатного шунта. (Гусев М.В., 1992)

Большинство фотосинтезирующих бактерий – строгие фототрофы и анаэробы. Однако как среди пурпурных, так и среди зеленых бактерий есть виды, способные расти гетеротрофно в темноте за счет дыхания. Пурпурные серобактерии родов *Thiocapsa* и *Amoebobacte* могут в темноте в присутствии кислорода окислять сероводород, тиосульфат, развиваясь автономно, подобно бесцветным серобактериям. Кроме того, для многих представителей несерных пурпурных бактерий была установлена их способность расти в темноте в анаэробных условиях за счет сбраживания сахаров и пирувата. Интересно, что некоторые виды серных пурпурных бактерий также могут развиваться в темноте в анаэробных условиях.

При всем разнообразии метаболических возможностей фототрофных бактерий способность к анаэробному фотосинтезу с использованием сероводорода является их главной особенностью. (Горленко, Дубинина, & Кузнецов, 1977)

Все фототрофные бактерии объединены в порядок *Rhodospirillates* на основании способности к анаэробному фотосинтезу при наличии бактериохлорофиллов a, b, c, d, e.

Пурпурные (родобактерии) и зеленые бактерии (хлоробактерии) выделены в два подпорядка соответственно: *Rhodospirillineae* и *Chlorobiinea*.

Эти две группы бактерий четко различаются по характеру пигментов и внутренней структуре фотосинтезирующего аппарата. Родобактерии содержат основные бактериохлорофиллы a или b и имеют хроматофоры визикулярного,

тубулярного и ламеллярного типов, окруженные двойной мембраной, связанной с цитоплазматической мембраной клетки.

Хлоробактерии содержат бактериохлорофиллы с, d или e и имеют фотосинтезирующие структуры особого типа – хлоробиумвезикулы, овальные тельца, расположенные на периферии клеток, окруженные одинарной белковой мембраной, прикрепленной к цитоплазматической мембране.

Подразделение на семейства как пурпурных, так и зеленых бактерий проблематично из-за нечеткости разделительных признаков. (Горленко, Дубинина, & Кузнецов, 1977)

Пфеннинг и Трюпер делят родобактерии подпорядка *Rhodospirillineae* на два семейства: *Rhodospirillaceae*, или несерные пурпурные бактерии, и *Chromatiaceae*, или серные пурпурные бактерии. Основное отличие этих двух семейств заключается в механизме использования сероводорода. Представители *Rhodospirillaceae* способны использовать H_2S как донор водорода, окисляя его только до S^0 или до SO_4^{2-} , минуя стадию молекулярной серы. Все виды способны использовать органические вещества как донор водорода и склонны к фотогетеротрофии. (Горленко, Дубинина, & Кузнецов, 1977)

Все бактерии семейства *Chromatiaceae* используют сероводород как донор водорода, окисляя его последовательно до S^0 и далее до SO_4^{2-} . Сейчас известны переходные формы родобактерий, обладающие всеми признаками как серных, так и несерных пурпурных бактерий. Они способны развиваться фототрофно на сложных органических средах, лишенных сероводорода и углекислоты, и растут аэробно в темноте. На минеральной среде эти же виды окисляют на свету сероводород, как это делают серные пурпурные бактерии. Видимо, родобактерии в будущем будут рассматриваться как целостная группа, без таксономического деления на серные и не серные.

Хлоробактерии подпорядка *Chlorobiineae* до недавнего времени включали лишь одно семейство *Chlorobiaceae*, так как все известные виды были строгими анаэробами и нуждались в сероводороде для фотосинтеза. Сейчас найдена новая группа нитчатых зеленых бактерий, способных к фотогетеротрофии. Эти бактерии не нуждались в сероводороде при росте на свету и могут развиваться гетеротрофно в темноте в аэробных условиях. На основании этих признаков их можно выделить в самостоятельное семейство *Chloroflexaceae*, включающие три рода – *Chloroflexus*, *Chloronema*, и *Oscillochloris*. (Горленко, Дубинина, & Кузнецов, 1977)

1.5. Экология микроорганизмов, окисляющих восстановленные соединения серы

В естественных условиях на границе раздела кислородных и сероводородных вод развивается сообщество микроорганизмов, осуществляющих биологическое окисление сероводорода. Толщина пограничной зоны может колебаться от 1 м в воде стратифицированных озер до нескольких миллиметров в иловых отложениях перемешиваемых водоемов. В этой области наблюдается резкое изменение окислительно-восстановительной обстановки, совпадающее с падением содержания сероводорода и нарастанием концентрации кислорода. Благодаря разнообразию условий в тесном соседстве уживаются как аэробные, так и анаэробные серобактерии. (Горленко, Дубинина, & Кузнецов, 1977)

Фототрофные бактерии, в большинстве своем строго анаэробные формы, являются первым барьером на пути распространения сероводорода в верхние горизонты. В случае достаточной освещенности они становятся главными потребителями сероводорода, используя его как H-донор при фотосинтезе. При дефиците сероводорода главным продуктом окисления является SO_4^{2-} , тогда как сера не накапливается. (Горленко, Дубинина, & Кузнецов, 1977)

Микроорганизмы осуществляют три важнейших этапа в превращении серы: минерализацию органической серы, окисление и восстановление минеральной серы. Эти этапы определяют три основные формы природной серы: органическую серу (белки, аминокислоты); сульфаты и сульфиты; сероводород и сульфиды. Так же следует отметить, что в природе может происходить так называемое «серное дыхание»: восстановление элементарной серы, осуществляемое анаэробными бактериями *Desulfuromonas acetoxidans*, использующие ее в качестве конечного акцептора электронов. Сера восстанавливается при этом также до сероводорода. (Лысак, 2005)

1.6. Факторы, влияющие на сохранность пигментов и каротиноидов

Различные лимнологические исследования показывают, что концентрация ископаемых пигментов является точным предиктором производства водорослей. Но экспериментальные и массовые исследования показывают, что > 90% пигмента разлагаются до бесцветных соединений перед постоянным захоронением. В самых широких пределах производства осаждение пигментов и концентрация ископаемых пропорциональны водорослевой культуре. Однако в более узком диапазоне фактическая концентрация пигмента в отложениях регулируется фото- и химическим окислением. Существуют три фазы потери: быстрое окисление в толще воды происходит за дни; более медленные потери после отложения в поверхностных отложениях происходят за годы; и очень медленная потеря двойных связей в глубоких отложениях происходит за столетия. Несмотря на потери во время осаждения, обилие ископаемых и водорослей остается коррелированным во времени, пока нет изменений в морфометрии бассейна, проникновении света, стратификации или содержании глубоководного кислорода. В самых лучших масштабах процессы пищевой сети могут повысить сохранность пигментов из съедобных водорослей путем включения пигментов в фекалии, которые быстро тонут и обходят потери в толще воды. Как следствие избирательной потери во время осаждения и первоначального захоронения, относительное содержание каротиноидов является ненадежным показателем состава сообщества фитопланктона.

Значительные усилия были направлены на количественную оценку причин и масштабов деградации пигмента как в толще воды, так и в отложениях. Исторически исследователи концентрировались либо на хлорофильных пигментах, которые легко обнаруживаются с помощью флуорометрии, либо на каротиноидах, которые требуют хроматографической изоляции, но могут идентифицировать отдельные группы производителей. Ранние исследования были в основном исследовательскими и стремились выявить основные тенденции в сохранении пигмента. С развитием быстрых, точных аналитических методов, последние исследования были сосредоточены на механизмах потери пигмента или на целостном балансе массы, предназначенном для сравнения потоков в различных условиях окружающей среды. Как и в случае с другими группами окаменелостей, относительно немногие исследователи напрямую сравнивали пигментные культуры и численность ископаемых. Ранняя количественная оценка деградации пигмента показала, что 33% каротиноидов водорослей (простых углеводов) и 97% ксантофитлов (кислородсодержащих производных) были потеряны до отложения в морском дне. Такая избирательная консервация также продолжалась в океанических отложениях с каротинами, концентрация которых становится преобладающей с глубиной захоронения.

Раннее доказательство селективного сохранения в озерных отложениях было представлено Фоггом и Белчером, которые исследовали органические растворители. Было обнаружено, что полярные гипофазные ксантофиллы снижаются в более старых отложениях по сравнению с эпифазными каротинами. Эта схема была интерпретирована как указание на избирательное окисление лютеина, ксантофилла высших растений и зеленых водорослей. К сожалению, сукцессии видов в результате известной эвтрофикации озера могут также привести к аналогичным картинам независимо от потерь пигмента после отложения. Более убедительные доказательства деградации озерного пигмента является то, что удельное содержание каротиноидов в отложениях увеличивается с глубиной воды. Глубоководные отложения, как правило, получают меньше света и кислорода, поэтому фотоокисление и биологическое разрушение пигментов меньше. Суэйн также предположил, что долгосрочное сохранение каротиноидов и хлорофиллов было сходным, поэтому изменения в соотношении групп пигментов отражали стратиграфические изменения в составе сообщества фитопланктона, предполагая, что не было никаких существенных изменений в среде осадконакопления. Brown (1969) написал раннюю литературу по каротиноидам и предположил, что потеря пигмента может происходить из-за выпаса травоядных, фотоокисления или старения клеток, либо в толще воды, либо после осаждения исходного материала. (Leavitt, 1993)

Лабораторные исследования деградации пигмента во время старения водорослей показали, что потеря пигмента особенно чувствительна к присутствию кислорода. Фох и соавт. (1944) обнаружили, что β -каротин из бурых водорослей не разлагался в течение 180 дней анаэробной инкубации в морской воде, в то время как количество твердых частиц «значительно уменьшилось». Крэнвелл (1976) также обнаружил, что β -каротин и эхиненон разлагаются с половиной скорости сине-зеленого органического вещества водорослей в афотических, анаэробных условиях, но отметил, что потери в два раза меньше, чем у частиц, если присутствует кислород. Точно так же Ливитт (1988) зарегистрировал небольшую анаэробную потерю каротиноидов после 37-недельной инкубации цианобактерий с водой или осадками, в то время как аэробная потеря уничтожила до 62% отдельных каротиноидов за тот же период. Ни Ливитт, ни Крэнвелл не обнаружили, что потеря ксантофилла постоянно превышала потерю каротинов; однако относительные скорости деградации пигмента варьировали в зависимости от вида водорослей (Cranwell, 1976). Хотя точный механизм действия не был установлен, кислород может способствовать потере каротиноидов как прямым окислением конъюгированного хромофора или путем стимуляции микробной активности. (Simpson K. L., 1981) Разложение хлорофилла может быть значительным во время старения водорослей и, по-видимому, происходит через простую потерю атомов Mg^{++} из гемового кольца хлорофиллов. Например, Daley (1973) и Daley & Brown (1973) обнаружили, что разложение водорослей приводит к быстрому превращению хлорофилла (+ Mg^{++}) в феофитин-а (- Mg^{++}), но одного лизиса клеток или

вирусной атаки недостаточно для конвертировать хлорофилла в феофорбид-*a*. Деградация хлорофилла до окрашенных производных, по-видимому, катализируется хлорофиллазой и, возможно, Mg^{++} . Мало что известно о механизмах, которые превращают хлорофиллы или феопигменты в бесцветные соединения в темноте (деградация II типа), кроме разрушения порфиринового кольца при включении молекулярного кислорода. (Brown, 1991)

Быстрые потери пигмента происходят еще и во время старения высших растительных материалов. Полевые исследования показывают, что пигменты в листьях наземных растений в основном разрушаются до осаждения в отложениях даже очень небольших озер. (Swain, 1985) Периоды полураспада хлорофилла в стареющих листьях лиственных деревьев составляют от 7 до 15 дней. Напротив, пигменты из макрофитов, вероятно, частично сохраняются в отложениях озер. Бьянки (1991) обнаружил, что потеря каротиноидов у возникающих речных макрофитов во время старения была меньше, чем у погруженных видов, но ни одна из них не была настолько быстрой, чтобы исключить использование пигментов в качестве биомаркеров. Например соотношение хлорофилла-*b* / лютеин можно использовать для определения относительной важности численности макрофитов, предполагая, что зеленые и сине-зеленые водоросли не являются важным планктоном. (Leavitt, 1993)

Механизм дегградации каротиноидов у стареющих растений или водорослей четко не установлен. Zechmeister (1962) показал, что цисизомеризация всех транс-пигментов может снизить стабильность каротиноидов в органических растворителях. Известно, что цисизомеры образуются в разлагающихся или хранящихся растительных и могут возникать в результате высыхания тканей или избыточного тепла, света или кислотности (Simpson K. L., 1981). Цис-каротиноиды также встречаются в озерных. Однако, поскольку цис-изомеры остаются легко обнаруживаемыми обычными способами, получение изомерных смесей следует рассматривать только как первый этап дегградации каротиноидов. В конечном счете, для разложения до цветных соединений требуется расщепление диеновой системы, так что остается менее семи сопряженных двойных связей. У некоторых высших растений полная дегградация каротиноидов достигается, когда пигменты выступают в качестве вторичных субстратов для ферментных систем ненасыщенных оксидаз. Было показано, что проглатывание водорослей травоядными сильно разлагает как каротиноиды, так и хлорофилл. Общее количество потери пигмента зависит от истории питания травоядного животного, концентрации пищи или скорости кормления, а также видов водорослей или травоядных животных. (Leavitt, 1993)

Значительная дегградация каротиноидов происходит при прохождении пигментов через кишки травоядных. Leavitt & Brown (1988) обнаружили, что хотя прохождение через Дафнию кишечника может привести к дегградации до 80% каротиноидов цианобактерий, потери пигмента, как правило, меньше, чем потери частиц органического углерода или азота. Head и Harris (1992)

отметили, что уничтожение хлорофилла-*a* морскими веслоногими ракообразными было меньше, чем у хлорофилла-*c* или каротиноидов, но предположили, что степень разрушения пигмента может варьироваться в зависимости от видов травоядных и водорослей. Подобная видоспецифичность в способности к разложению была отмечена Carpenter и Bergquist (1985) при сравнении пресноводных кладоцер и коловраток. Эти исследования показывают, что выпас скота вызывает существенную, но неселективную деградацию пигмента, и что содержание пигмента на единицу органического вещества может фактически увеличиться после прохождения кишечника. До сих пор точный механизм деградации каротиноидов для беспозвоночных не был определен, хотя у высших животных пигменты растворяются липазами, эстеразами и протеазами до насыщения двойной связью (Simpson K. L., 1981).

Потеря каротиноидов водорослей может быть результатом поглощения пигмента травоядными. Чистые пигменты, питаемые дафнией, либо включаются в ткани тела животных в виде каротинопротеинов, разлагаются до бесцветных продуктов, либо проходят через кишечник без повреждений. После ассимиляции каротиноиды могут храниться в липидных телах и яйцах в виде каротинопротеинов. Количество поглощенного каротиноида и, следовательно, содержание тела зависит от прозрачности воды, концентрации пищи, наличия других светопоглощающих пигментов у травоядных и, возможно, от видов травоядных. Так же существует значительная изменчивость, сезонность и вариабельность развития количества пигмента на животное, что позволяет предположить, что каротиноиды остаются метаболически активными после ассимиляции. В отличие от каротиноидов, хлорофильные пигменты, по-видимому, не усваиваются водными беспозвоночными. (Leavitt, 1993)

Каротиноиды и хлорофилл быстро отбеливаются светом в присутствии кислорода. Поглощение света хлорофиллом может привести к образованию высокоактивной, метастабильной триплетной молекулы в возбужденном состоянии. Возбужденный триплет хлорофилла может затем подвергнуться окислительно-восстановительным реакциям, приводящим к образованию радикальных соединений, которые катализируют дальнейшее повреждение клеток, включая окисление пигмента (фотореакция типа I). С другой стороны, возбужденный хлорофилл может взаимодействовать с кислородом, самой молекулой триплета, с образованием основного состояния хлорофилла и синглетного кислорода (фотореакция типа II). Синглетный кислород быстро реагирует с большинством соединений, которые содержат двойные связи. Каротиноиды быстро отбеливаются путем добавления кислорода через полиеновую цепь, после чего следует отбеливание хлорофилла. Например, было показано, что ингибирование синтеза каротиноидов ускоряет окисление хлорофилла у высших растений, водорослей и фотосинтетических бактерий (Paerl H. W., 1984). Во всех случаях молекулярный кислород был необходим для фотодеградации пигмента.

Полевые исследования деградации каротиноидов и хлорофилла обычно принимают одну из двух форм: а) сравнение пигментов из планктона, отложений и поверхностных отложений; или б) экспериментальное определение констант распада. Иногда эти меры комбинировались с оценками производства пигмента для расчета баланса массы потока пигмента. Несмотря на этот широкий спектр методов, результаты исследований *in situ* оказались удивительно однородными - большинство пигментов в обломочном материале разлагаются до постоянного включения в озерные и океанические отложения. Деградация водорослевого пигмента, по-видимому, имеет три основные фазы, каждая с уникальным набором констант скорости. Наиболее быстрое разрушение происходит при гибели клеток и детрита. За это время может ухудшиться до 99% вертикального потока каротиноидов и хлорофиллов. Материал, который осаждается на границе раздела осадок-вода, продолжает разлагаться с пониженной скоростью, которая зависит от количества потери пигмента в толще воды, а также от химической и фаунистической среды. Третья серия деградационных процессов, по-видимому, намного медленнее и действует тысячелетиями, систематически снижая уровни каротиноидов и хлорофилла. Несмотря на кажущуюся непреодолимую угрозу разрушения, из пресноводных и морских отложений было извлечено большое количество немодифицированных каротиноидов, возраст которых превышает 20000 лет. (Leavitt, 1993)

Краткосрочные сравнения численности водорослей и потока пигментов с отстойниками или поверхностными осадками позволяют предположить, что некоторые пигменты количественно не представляют собой водорослевые или каротиноидные культуры в толще воды. Пигменты из динофлагеллятов редко сохраняются в ловушках или отложениях. Аналогично, пигменты из диатомовых водорослей и хризофитов (фукоксантин, с-форбины) обычно более лабильны, чем пигменты, происходящие из зеленых водорослей (лютеин, *b*-форбин), цианобактерий (зеаксантин, *a*-форбин) или криптофитов (аллоксантин, β -каротин, *a*-форбинс). Материал отстойника часто представляет собой аллоксантин по сравнению с измеренным количеством криптофитов. Смещение увеличивается с глубиной в толще воды, что приводит к доминированию аллоксантина в поверхностных отложениях многих водных систем. Избирательное сохранение аллоксантина, по-видимому, обусловлено двумя механизмами: включением в быстро тонущий фекальный материал травоядных животных и продукцией в глубоководных слоях, сходных с таковыми фотосинтетических бактерий.

Исследования, сравнивающие планктонный пигментный состав с составом, извлеченным из материала ловушки, показывают, что травоядные животные изменяют поток и относительное содержание пигмента. Repeta и Gagosian (1981, 1982, 1984) сообщили, что ацетатный гидролиз фукоксантина из диатомовых водорослей в фукоксантинол был вызван травоядными копеподами. Другие пигменты были разложены до бесцветных соединений,

включены в ткани тела веслоногих ракообразных или не пострадали. Интересно, что исследования тонущего фекального материала показывают, что даже самые вязкие гранулы диссоциируют в течение нескольких дней, особенно в теплой воде. Следовательно, смещение в записях окаменелости из-за травоядности может быть уменьшено в очень глубоких озерах или океанах. (Leavitt, 1993)

В общем, фотоокисление, по-видимому, является наиболее важным процессом единичной потери пигментов в тонущем обломочном материале. Фото-окислительные периоды полураспада для каротиноидов и хлорофиллов могут составлять всего 0,2 дня, но могут варьироваться в зависимости от состава фитопланктона и наличия гуминовых кислот или других соединений, поглощающих свет. Часто время, необходимое для отбеливания, меньше времени, необходимого для погружения детритирующих пигментов в темноту. В результате осадочный поток пигментов может быть смещен в сторону пигментов в быстро тонущем материале или которые происходят из глубины фотической зоны. Важность фотоокисления для живых водорослей пока неясна, потому что фитопланктон не страдает от потери пигментов из-за обесцвечивания, за исключением крайних случаев, таких как поверхностное цветение (Paerl H. W., 1984).

Потери пигмента во время афотического разложения водорослей регулируются содержанием кислорода и продолжительностью воздействия гипolimнетических вод в озерах. Скорость распада также зависит как от состава сообщества водорослей, так и от обработки микрофауной детрита. Кроме того, константы скорости распада сильно различаются между каротиноидами, причем вездесущий β -каротин является наиболее стабильным каротиноидом, а перидинин (из динофлагеллят) и фукоксантин (золотые и коричневые водоросли) - наиболее лабильными. У каротина и других стабильных каротиноидов отсутствуют эпоксидные функциональные группы. Деградация хлорофилла-*a* обычно больше, чем у каротиноидов, но варьируется от озера к озеру, как с точки зрения потери абсолютного значения, так и количественного преобразования в узнаваемые производные. Напротив, потери пигмента во время разложения водорослей в морских системах часто считались тривиальными по сравнению с отбеливанием или травоядностью. (Leavitt, 1993)

При оценивании производства пигмента по показателям фиксации ^{14}C , можно построить количественные модели баланса массы для изучения источника и судьбы растительных пигментов. Массовые запасы хлорофилла показали, что важность отдельных процессов распада может варьироваться в зависимости от структуры пищевой цепи как в пресноводных, так и в морских системах. В пресных водах кратковременные скорости оседания пигмента могут быть не связаны с первичной продукцией, если их измерять как скорости фиксации углерода. Однако седиментация пигмента может быть положительно коррелирована ($P < 0,05$) с размером травоядного животного. Следовательно, введение крупных травоядных в сообщество травоядных может снизить потери

пигмента при фотоокислении и увеличить общий поток летнего форбина в 2-3 раза независимо от скорости образования пигмента. Массовые запасы также показывают, что производство и отложение пигмента в толще воды можно отделить, сосредоточив пигментосодержащие отложения в глубоководных участках.

После отложения в осадках пигменты продолжают разлагаться, хотя и с гораздо меньшими скоростями. Недавние исследования были сосредоточены на относительно быстрых потерях, которые происходят в материале, осажденном в пределах 5-10 лет, а не потери за тысячелетия. Сравнение пигментов в воде или ловушках и коротких ядрах показывает, что многие диатомовые пигменты (диадиноксантин, фукоксантин, хлорофилл-*c*) и феофорбид а продолжают разлагаться быстрее, чем другие пигменты. Частично эти быстрые потери возникают в результате структурных перестроек, которые разрушают эпоксикаротиноиды и образуют феопигменты. Как правило, потери пигмента в бескислородных отложениях составляют только половину от тех, которые регистрируются, если кислород проникает к поверхности раздела осадочных вод, предположительно из-за прямого окисления и повышенной активности зообентоса в аэробной среде. Трансекты в озерных бассейнах также показывают, что деградация пигмента в глубоких водах и поверхностных отложениях влияет на концентрацию ископаемого пигмента. Множественные керны в отдельных бассейнах регулярно показывают, что концентрации пигментов являются самыми низкими в отложениях, подверженных воздействию насыщенных кислородом вод. (Swain, 1985)

Сравнение стратиграфии с мелкими интервалами из разных озер показывает, что содержание пигмента часто быстро уменьшается с глубиной захоронения в верхних 1-3 см отложений, особенно в высокопродуктивных озерах. Такие паттерны могут возникать из-за неполной деградации пигмента во время погружения и продолжающихся потерь лабильных фракций после осаждения. Степень потерь зависит от озера и пигмента и будет зависеть от степени деградации во время погружения, содержания кислорода в отложениях и вышележащих водах, активности беспозвоночных и накопления крупных отложений. Такая быстрая деградация после отложения может затенить стратиграфические интерпретации пигментов, которые находятся в этой «зоне деградации», особенно для событий, которые обычно регистрируются как повышенное отложение пигмента. Будучи закопанными ниже зоны быстрой деградации, пигменты могут продолжать разлагаться в течение тысячелетия. Однако длительная деградация каротиноидов после отложения может отличаться в озерной и морской среде.

Сравнения данных о численности фитопланктона и окаменелых пигментах редки, но, как правило, делятся на три категории: короткие, специфические для конкретного участка исследования, часто с участием массовых запасов; географические сравнения по градиенту производительности; и сравнение исторических данных с ископаемыми

профилями. Исследования на конкретных участках четко количественно определяют пути и потоки пигментов, но они, как правило, краткие (<3 года) и дают сильно разнящиеся оценки производства и потерь. Кроме того, в бюджетных исследованиях может наблюдаться слишком узкий диапазон условий окружающей среды, чтобы определить важные, но переменные процессы контроля. Напротив, географические сравнения обычно охватывают несколько порядков производства водорослей. Однако такие исследования имеют ряд недостатков, включая: неконтролируемые, но изменчивые условия осаждения (морфология бассейна, химия воды); переменные аллохтонные входы; неадекватный хронологический контроль (осадки смешиваются или охватывают много возрастов); и относительно плохие оценки годового производства. Хотя сравнение ископаемых и исторических данных обычно облегчает первые две проблемы, они по-прежнему страдают либо от низкого качества данных, либо от грубого временного разрешения в ядрах. (Leavitt, 1993)

Gorham и его коллеги. (1974) предоставили первое четкое доказательство того, что ископаемые каротиноиды и хлорофиллы отражают распространенность водорослей в ходе обследования в районе Озерного края в Великобритании. Объемные осадочные пигменты были оценены как произвольные единицы поглощения и были выражены на единицу органического вещества, чтобы «отразить степень сохранения пигмента относительно органического матрикса». Линейные корреляции между осадочными каротиноидами и водорослевой укороченной культурой (г сухой массы 1-1) были превосходными ($r = 0,90$), а также логарифмические отношения между водорослевой укороченной культурой и осадочной массой хлорофиллов ($r = 0,83$) и между эпилимнетическим и ископаемым хлорофиллом ($r = 0,74$). Сильные корреляции между планктоном и ископаемыми привели авторов к выводу, что большинство осадочных органических веществ и пигментов имеют автохтонное происхождение. Другие географические исследования зафиксировали значительную связь между толщиной воды хлорофилла и концентрацией ископаемых пигментов. Несмотря на использование поверхностных отложений, Flannery и другие (1982) обнаружили, что эпилимнетический хлорофилл и ископаемый хлорофилл были линейно коррелированы ($r = 0,48$). Это отношение включало две неглубокие эвтрофные системы и два глубоких олиготрофных озера; системы, которые могут быть аномальными из-за бентической или глубоководной добычи, которая обычно не отбирается пробами планктона. Устранение этих выбросов значительно улучшило корреляции. (Leavitt, 1993)

Во всех случаях, когда планктон и ископаемые находились в корреляции, исследователи использовали концентрацию пигмента (вес на единицу органического вещества) в качестве показателя содержания ископаемых. Хотя это говорит о том, что концентрация ископаемых возрастает линейно с ростом водорослей, Swain (1985) указал, что концентрации пигментов в отложениях

олиготрофных озер могут быть низкими в следствии ряда причин: увеличения деградации перед захоронением; снижение скорости захоронения в бескислородных отложениях; высокое разбавление пигментом бедных земных органических веществ; и снижение производства пигмента на единицу органического вещества. На сегодняшний день только первые два фактора получили значительную эмпирическую поддержку. (Leavitt, 1993)

Исторические данные были использованы для подтверждения интерпретаций, вытекающих из анализа ископаемых пигментов. В отличие от ранее проведенных исследований, эти исторические «калибровки» часто используют индикаторные пигменты, а не общие каротиноиды и хлорофиллы. Например, Griffiths (1969) исследовал 5 кернов из озера Вашингтон и обнаружил общее согласие по всему бассейну между ископаемыми образцами осциллаксантина и историческим появлением осцилляций. Сравнение скорости производства и накопления отложений показало, что ископаемые пигменты переоценивают урожай водорослей в 7-13 раз, возможно, из-за концентрации осадка или неадекватного отбора проб. Когда 6 лет спустя те же участки были пересчитаны, исторические закономерности остались, и недавние сокращения числа осцилляций были точно представлены. Еще раз, исторические максимумы водорослей не были хорошо зарегистрированы в профилях отложений из-за неадекватного отбора проб планктона. Точно так же Leavitt (1989, 1993) и Hurley (1992) нашли хорошее общее соответствие между историческими данными и профилями ископаемых каротиноидов. Хотя относительное содержание пигментов не было информативным из-за избирательной деградации каротиноидов, внутризонные изменения отдельных пигментов действительно выявили основные изменения в производстве групп водорослей, известные из периодических исторических данных.

При наличии высококачественных исторических данных корреляция между ископаемыми пигментами и распространенностью водорослей может быть удивительно хорошей. Например, Leavitt и Findlay (1994) сравнили ископаемые пигменты в разнообразных отложениях с 20-летними данными по фитопланктону из экспериментально эвтрофированного озера. После оплодотворения концентрации повсеместно распространенных пигментов (β - каротин, феофитин-*a*) сильно коррелировали с общей биомассой водорослей в течение свободных ото льда сезонов ($r = 0,56-0,65$; $P < 0,01$), как и индикаторные пигменты цианобактерий (эхиненон, афанизофилл) и хлорофиты (лютеин, феофитин-*b*) ($r = 0,53-0,55$, $P < 0,05$). Напротив, каротиноиды из криптофитов (аллоксантин, с-каротин) слабо коррелировали с биомассой водорослей ($r = 0,32-0,40$, $P < 0,10$), тогда как пигменты из диатомовых и хризодитных (фукоксантин, хлорофилл-*c*) или динофлагеллятов (перидининин) были некоррелированы с биомассой. Как правило, корреляции улучшались при снижении специфичности пигмента (β - каротин > феофитин *a* > лютеин + зеаксантин > феофитин *b* > эхиненон > афанизофилл > другие). В отличие от концентрации окаменелостей, скорости накопления пигментов (пигмент *n*-

молей m-2 y-1) не коррелировали с культурой или продукцией водорослей, но сильно коррелировали между пигментами из неродственных таксонов водорослей. Быстрая деградация пигмента в поверхностных осадках, выборочно смещенная оценка скорости накопления пигмента. Напротив, концентрации каротиноидов, специфичных для органического вещества, были менее предвзятыми, поскольку деградация основного органического вещества частично компенсировала потери каротиноидов. В целом, показатели накопления пигментов были менее удовлетворительными, чем концентрации ископаемых, при выявлении годовых изменений в составе сообщества фитопланктона. (Leavitt, 1993)

1.7. Динамика стратификации озера Шира

В 2015 и 2016 годах стратификация озера Шира изменилась от меромической к голомической. Это явление было задокументировано впервые. Смешивание имело место в позднем подледном периоде, т.е. после середины марта 2015 и 2016 годов. Скорее всего, наиболее влиятельным фактором, способствующим зимнему перемешиванию в 2015 году, было сильное воздействие ветра из-за раннего таяния льда весной 2014 года (Rogozin, и др., 2017). Причины глубокого перемешивания 2016 года не столь очевидны, но перемешивание, вероятно, было менее выражено, чем в 2015 году, насколько можно судить из присутствия следовых концентраций сульфида в придонных слоях. В марте 2017 года смешивание не было глубоким, и озеро снова стало меромиктическим. Таким образом в настоящее время режим перемешивания озера Шира может значительно различаться в следствии своей чувствительности к внешним факторам.

Смешивание озер во многом определяется профилями плотности весны. В свою очередь, весеннее ветровое напряжение является важным фактором, влияющим на устойчивость начальных профилей в начале периода открытой воды, а следовательно, и на устойчивость осенних профилей к перемешиванию. (Rogozin, и др., 2017)

В период с 2002 по 2007 г. увеличение притока пресной воды вызвало повышение уровня озера, увеличив стабильность водной толщи и, следовательно, уменьшив глубину осеннего перемешивания. Кроме того, воздействие ветра был намного ниже в этот период. Поэтому сочетание притока пресной воды с относительно слабым ветровым воздействием поддержало устойчивый меромиксис озера. В период с 2007 по 2015 год уровень воды не повышался, что уменьшало устойчивость водной толщи и делало миксолимнион озера более чувствительным к воздействию ветра, которое также увеличилось. Поэтому мы не можем отделить влияние повышения уровня от влияния увеличения ветра на стратификацию озера за период исследования.

Значительное увеличение количества органического углерода, хлорофилла-*a*, биомассы веслоногих ракообразных *Arctodiaptomus salinus* и количества фитофлагеллят, наблюдавшихся в толще воды в начале лета 2015 г., возможно, связано с выделением питательных веществ в фотическую зону во время смешивания монимолимниона. Исчезновение пурпурных серных бактерий из монимолимниона было следствием разрушения меромиксиса. (Rogozin, и др., 2017)

1.8. Хроматография. Жидкостная хроматография низкого и высокого давления. Схема жидкостного хроматографа высокого давления

Хроматография - это один из методов пробоподготовки. При анализе сложных смесей для уверенного определения количества интересующего компонента практически всегда необходима подготовка пробы к анализу: экстракция, кристаллизация, выпаривание, соосаждение и т.д. Один из методов такой подготовки пробы является процесс хроматографирования, т.е. разделения сложной смеси на составляющие компоненты. (Орлов В.И., 1997)

В настоящее время требуется детальный химический анализ разнообразных смесей и биологических объектов. Решение этой задачи невозможно без применения достаточно эффективных методов разделения сложных смесей. Среди таких методов доминирует хроматография. Бурно развиваясь в последние десятилетия, этот метод открыл возможность разделения смесей, содержащих десятки и сотни компонентов, их количественный и качественный анализ, препаративное выделение индивидуальных веществ. Так как принципы хроматографии весьма универсальны, она оказалась пригодной для изучения объектов самой разной природы, от нефти и газов атмосферы до белков и даже вирусов. (Орлов В.И., 1997)

Первые установки для проведения экспериментов по жидкостной хроматографии были очень простыми. Фактически, они состояли из одной хроматографической колонки. Поскольку в то время были доступны только адсорбенты с достаточно крупными частицами, элюент мог свободно проходить через слой адсорбента под собственной тяжестью. Таким образом, необходимость использования насоса для подачи элюента под значительным давлением отсутствовала. Поскольку первые эксперименты по разделению проводились на образцах смесей натуральных пигментов (красителей), видимых глазом, то в этом случае можно было обойтись без детектора. (Сычев, 2010)

Описанные устройства относятся к хроматографическим системам низкого давления. Разумеется, современные специализированные системы жидкостной хроматографии под низким давлением могут представлять собой сложные и дорогостоящие приборы. Но их объединяет использование адсорбентов с достаточно крупными частицами, в результате чего давление в таких системах не превышает нескольких атмосфер.

Техника проведения эксперимента по разделению при низком давлении достаточно проста.

Сначала берут специальную стеклянную трубку длиной около 20 см и диаметром 1–2 см с пористым стеклянным фильтром на дне и сужающимся

горлышком. Затем ее закрепляют на штативе в вертикальном положении. Аккуратно переносят в колонку 5–8 см адсорбционного материала – пористого порошка с зернением (средним диаметром частиц) порядка 100 микрометров, то есть 0,1 мм. Колонка готова. (Сычев, 2010)

Обычно на такую колонку пробу не наносят в жидком состоянии – поступают несколько иначе. Жидкую пробу смешивают с адсорбентом и с минимальным нагреванием отгоняют растворитель. Высушенный адсорбент с нанесенной пробой переносят в колонку и тонким слоем (0,1–0,5 см) распределяют поверх слоя адсорбента. Смешиванием растворителей готовят необходимый объем элюента. И, наконец, проводят элюирование, время от времени добавляя элюент через верхнюю открытую часть колонки. Фракции элюата отбирают в пронумерованные градуированные стаканчики или колбы. Хроматограмму можно построить, измеряя какое-либо свойство каждой из фракций: поглощение света в видимом или ультрафиолетовом (УФ) диапазоне, показатель преломления света, электропроводность, активность, радиоактивность и т.д. Все перечисленные методы относятся к методам детектирования.

Системы низкого давления позволяют работать с большими объемами адсорбента, что является необходимым условием для хроматографического выделения больших количеств целевых веществ высокой чистоты. Хроматография, целью которой является не анализ, а выделение чистых веществ из содержащих их субстанций, называется препаративной хроматографией. Колонки для промышленных установок препаративной хроматографии могут достигать 0,5–3 м в диаметре и длины в несколько метров. (Сычев, 2010)

Но для целей аналитической химии хроматография низкого давления непригодна. У нее есть существенный недостаток: сравнительно низкая разрешающая способность. Это значит, что хроматографические зоны компонентов получаются очень широкими, и для полного разделения компонентов требуется очень большое различие во времени удерживания. Что на практике редко встречается. Очевидно, что в этом варианте сложно достичь очень хорошего разделения. Кроме того, для элюирования компонентов требуется довольно значительное время.

Причина невысокой разрешающей способности – применение адсорбентов с крупными частицами. Для того, чтобы жидкостная хроматография могла выполнять задачи аналитической химии, необходимо уменьшить средний диаметр частиц адсорбента по крайней мере до 10 микрометров, то есть до 0,01 мм. Подобные адсорбционные материалы стали широко доступны только в начале 70-х годов прошлого века. Переход на новые мелкозернистые адсорбенты повлек за собой революционные изменения в технике для проведения разделений методом жидкостной хроматографии. (Сычев, 2010)

Для того, чтобы жидкость (элюент) могла пройти через трубку длиной 15–25 см, плотно упакованную мелким порошком со средним размером частиц 3–5 микрон (то есть колонку для аналитической хроматографии), необходимо создать значительное давление порядка 100–200 атмосфер. Создать такое давление можно лишь при помощи специального и притом достаточно дорогостоящего насоса высокого давления. Жидкостная хроматография высокого давления получила название высокоэффективная жидкостная хроматография, ВЭЖХ (highperformanceliquidchromatography, HPLC). ВЭЖХ широко применяется как один из наиболее универсальных методов физико-химического анализа вещества.

Колонка для ВЭЖХ, заполненная определенным адсорбентом, является, по сути, промышленно выпускаемым изделием. Она представляет собой стальную (как правило) трубку длиной от 5 до 25 см и внутренним диаметром от 2 до 4,6 мм, которая заполнена адсорбентом определенной марки. Колонка симметрична; с каждой стороны на нее устанавливают пористый фильтр из губчатого титана и съемную (как правило) уплотнительную гайку. Циркулирующая жидкость подводится к колонке и отводится от нее по пластиковым капиллярам, которые закрепляются на концах колонки при помощи специальных уплотнительных винтов – фитингов. На современных аналитических колонках для жидкостной хроматографии можно полностью разделить до двух-трех десятков компонентов за 10–15 мин. (Сычев, 2010)

Но за все хорошее, как известно, надо платить: для проведения определений методом ВЭЖХ одной колонки уже недостаточно – здесь требуется целый прибор, который называется жидкостным хроматографом (liquidchromatograph). Как мы уже выяснили, для ВЭЖХ нужен насос высокого давления. Кроме того, для ввода (инжектирования) пробы под давлением также необходимо специальное устройство, которое называется инжектором (injector). Наконец, аналитический прибор не может обойтись без высокочувствительного детектора (detector).

Задача детектора состоит в том, чтобы «замечать» самые различные вещества, выходящие из хроматографической колонки, даже в наинизшей концентрации, и количественно отображать сигналы от компонентов разделенной смеси на хроматограмме. (Сычев, 2010)

1.9. Окенон

Являясь уникальным катокаротиноидом, окенон был обнаружен во многих пурпурных серных бактериях. Его важность заключается в уникальных свойствах поглощения света и фотозащиты. Отличительные абсорбционные свойства окенона дают сильное преимущество ПСБ, в следствие чего они способны колонизировать более глубокие слои воды. В соответствии с этой функцией экситонная энергия эффективно переносится из окенона в бактериохлорофилл *a*. (Vogl K, 2011)

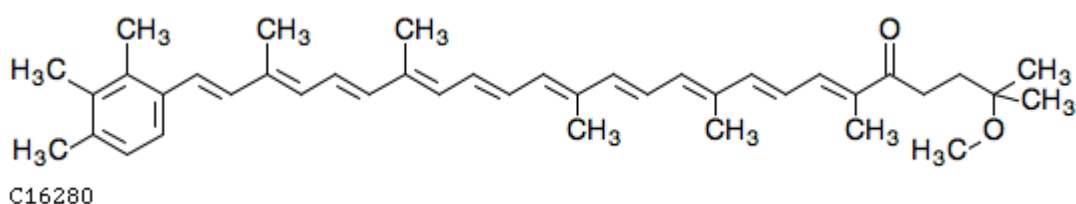


Рисунок 1 – структурная формула окенона. Химическая: $C_{41}H_{54}O_2$ (COMPOUND: C16280, б.д.).

Окенон впервые был описан в 1963 г., а предложенная структура была подтверждена полным синтезом в 1967 году. Окенон является моноциклическим ароматическим каротиноидом, который имеет χ -кольцо в качестве одной концевой группы. End-конец с открытой цепью метоксилирован у атома C-1, а также имеет кетогруппу у C-4'. *Thiodictyon* sp. CAD16, представляющая собой ПСБ, выделенную из озера Кадагно, Швейцария, синтезирует окенон как единственный каротиноид в условиях бескислородного, хлорофототрофного роста. Были идентифицированы два генных продукта, CrtY и CrtU, необходимые для синтеза χ -кольца окенона в этой ПСБ. Ликопен-моноциклаза типа CrtY циклизует одну end-концевую группу предшественника ликопена и образует β -кольцо. В-кольцо γ -каротина впоследствии превращается в χ -кольцо с помощью CrtU, γ -каротин-десатуразы / метилтрансферазы, которая филогенетически более тесно связана с белками CrtU зеленых серных бактерий, чем с механически сходными, но филогенетически удаленными белками CruE цианобактерии (21). Основываясь на знании биосинтеза каротиноидов в других организмах, следующие реакции предсказывают модификацию оставшейся remaining-концевой группы. 1', 2'-двойная связь должна быть гидратирована таким образом, чтобы гидроксильная группа находилась в положении C-1'. Используя S-аденозил-1-метионин в качестве метильного донора, O-метилтрансфераза впоследствии метилирует гидроксильную группу. Введение кетогруппы в C-4' завершило бы этот предсказанный путь. (Vogl K, 2011)

Характеристика видового состава ПСБ. Во все даты в анаэробной зоне озера преобладал морфотип ПСБ, по форме, размерам и характеру

агрегирования схожий с ранее описанным в работе Луниной и соавторами (Лунина и соавт., 2007б) видом, родственным *Lamprocystis purpurea*, и выделенным нами из оз. Шира штаммом *Thiocapsa* sp. Shira_1 (AJ633676 в EMBL/GenBank) (Рогозин и соавт., 2010). Пигментный анализ подтвердил доминирование окенон-содержащих ПСБ в анаэробной зоне данного озера. А именно: в спектре поглощения ацетоновых экстрактов в редокс-зоне и анаэробной зоне наблюдался характерный пик поглощения на 488 нм с плечом в районе 504 нм и основной пик поглощения Бхл а на 772 нм. Аналогичный по форме пик наблюдался и в спектре чистой культуры *Thiocapsa* sp. Shira_1 (Рогозин и соавт., 2010).

Максимум поглощения окенона приходится на 488-524 нм (Derek Smith, 2014).

2. Материалы и методы

2.1. Озеро Шира

Озеро Шира ($54^{\circ} 30'$ с. ш., $90^{\circ} 11'$ в. Д.) расположено в северной части Республики Хакасия, в 15 км от поселка Шира. Это солоноватый водоем, минеральный состав сульфатно-хлоридо-натриево-магниевый. Имеет эллиптическую форму 9,35 на 5,3 км, площадь водной поверхности 35,9 км², средняя глубина 11,2 м, максимальная – 24 м. озеро бессточное, питание его осуществляется за счет реки Сон, а также атмосферных, подземных, и антропогенных поступлений. Замерзает в конце ноября, освобождается ото льда в начале мая. В настоящее время водоем меромиктический, средняя соленость в миксолимнионе в период исследований около 15 г*л⁻¹, а в монимолимнионе – около 19 г*л⁻¹. Однако глубина миксолимниона нестабильна и менялась в разные годы и в разные сезоны в диапазоне от 11 до 16 м, что зависело и от погодных условий. Озеро является популярным местом отдыха, обладает бальнеологическими свойствами, на его берегу более ста лет функционирует известный курорт «Озеро Шира». (Rogozin, и др., 2017)

2.2. Отбор проб

Отбор осадочного материала производился седиментационными ловушками, выставленными на глубину 20 м. Затем они выдерживались на протяжении периодов от нескольких месяцев, до более года (единственный случай, когда ловушку нашли не сразу). Даты постановки/выемки ловушки указаны в таблице.

После выемки цилиндры ловушек отстаивали в течение 4 часов. После сливали верхнюю воду, оставляя примерно ок. 1 литра для дальнейшего анализа. Осадочный материал хранили в пластиковых бутылках в полной темноте при температуре +4⁰ С.

Таблица 1 Ловушки донных отложений озера Шира.

Номер ловушки	Дата постановки	Дата выемки	Время выдержки, сутки
-1	14 марта 2012	26 мая 2012	74
0	27 мая 2017	7 июля 2012	41
1	8 июля 2012	4 сентября 2012	58
2	4 сентября 2012	24 октября 2012	50
3	24 октября 2012	31 мая 2013	219
4	16 марта 2013	31 мая 2013	76
5	31 мая 2013	8 июля 2013	39
6	10 июля 2013	3 сентября 2013	55
7	4 сентября 2013	23 октября 2013	49
8	24 октября 2013	26 мая 2014	214
9	13 марта 2014	26 мая 2014	74
10	28 мая 2014	9 июля 2014	41
11	30 мая 2015	6 августа 2016	434
12	10 марта 2016	25 мая 2016	76
13	25 мая 2016	3 августа 2016	70
14	6 августа 2016	16 октября 2016	71
15	16 октября 2016	27 мая 2017	223
16	11 марта 2017	27 мая 2017	77
17	27 мая 2017	24 октября 2017	150
18	4 августа 2017	24 октября 2017	81
19	24 октября 2017	30 мая 2018	218
20	27 февраля 2018	30 мая 2018	92
21	30 мая 2018	4 августа 2018	66
22	4 августа 2018	21 октября 2018	78

3. Результаты и обсуждение

3.1. Экстракция каротиноидов

Экстракцию каротиноидов из осадочного материала и водной взвеси проводили по методике изложенной Wrightetal., следующим образом. Для начала, после интенсивного перемешивания/гомогенизации бутылок с донными осадками из них отбирали ок. 55 мл в пробирку – фалькон. После центрифугирования на 6000 об/мин в течение 20 мин, супернатант сливали и полученный осадок заливали 5 мл 90 % ацетона, гомогенизировали встряской и оставляли на ночь в морозилке (-20⁰ С). Затем центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин и забирали супернатант для дальнейшего анализа. Все операции проводили при слабом освещении для предотвращения фото-деградации каротиноидов.

Хроматографический анализ каротиноидов

Анализ проводился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на установке Agilent 1200 (AgilentTechnologies, Калифорния, США) с диодно-матричным (DAD) детектором, на колонке Eclipse XDB - C-18, средний диаметр частиц 5 микрон, размеры 4.6×150 мм. Элюент и пробы предварительно проходили через пред-колонку Eclipse XDB-C18 ср. диаметр частиц 5 микрон, размеры 4.6×12.5 мм, разделение проводилось при температуре 40⁰ С. Для хроматографического разделения использовали протокол Wrighteta (Таблица 2) изначально предназначенный для фотопигментов морских экосистем. Были использованы следующие элюенты – А – деионизированная вода, В – ацетонитрил (HPLC-grade), С – метанол(HPLC-grade) : 0,5 М ацетат аммония (в воде) (80:20), D – этилацетат.

Таблица 2 – Протокол применяемого хроматографического разделения. Отчет времени ведется с момента ввода пробы

Время, мин	Скорость протока, мл/мин	Доля элюента А, %	Доля элюента В, %	Доля элюента С, %	Доля элюента D, %
0	1	0	0	100	0
4	1	10	90	0	0
18	1	2	18	0	80
21	1	10	90	0	0
24	1	0	0	100	0
29	1	0	0	100	0

Сигнал в исследуемых образцах регистрировался DAD-детектором. Настройки диодной матрицы: длина волны поглощения – 455 нм (для каротиноидов) и 655 (для хлорофилла А), длина волны сравнения 880 нм.

Идентификация каротиноидов и оценка концентраций

Стандарт окенона, используемый для его идентификации в пробах и оценки концентрации, был получен Рогозиным Д.Ю. и др. из биомассы штамма ПСБ *Thiocapsasp. Shira_1*, выращенной на жидкой среде.

Концентрации всех каротиноидов оценивали по калибровке, сделанной для окенона, исходя из того, что оптические свойства всех ксантофиллов не сильно различаются.

Расчет концентрации каротиноида на сухой вес осуществлялся по формуле:

$$C_{св} = C_{пр} * V_{э} / m_{с}; (1)$$

Где, $C_{св}$ – коцентрация каротиноида на сухой вес,

$V_{э}$ – объем экстракта (в нашем случае он равен 5 мл),

$m_{с}$ – Масса сухого веса в пробе.

Расчет концентарции каротиноида во взвеси расичитывался по формуле :

$$C_{вз} = C_{пр} * \frac{V_{э}}{V_{пр}}; (2)$$

Где $C_{вз}$ – концентрация каротиноида во взвеси,

$V_{э}$ – объем экстракта (5 мл)б,

$V_{пр}$ – объем пробы (в нашем случае 55 мл).

Расчет осадконакопления окенона осуществлялся по следующей формуле:

$$F_{п} = C_{вз} * \frac{V_{лов}}{S_{лов} * T_{экс}}; (3)$$

Где, $F_{п}$ – поток пигмента, $\text{мкг}/\text{м}^2/\text{сут}$,

$C_{вз}$ - концентрация пигмента во взвеси,

$V_{лов}$ – остаточный объем ловушки (0,9 л);

$S_{лов}$ – площадь основания ловушки ($0,008328 \text{ м}^2$),

$T_{экс}$ – время экспозиции(выдержки) ловушки.

3.2. Современная динамика пурпурных серных бактерий в озере

На озере Шира проводится круглогодичный мониторинг фототрофного сообщества водоема. С этой целью в ходе каждой экспедиции измеряется концентрация фототрофных пигментов, а именно хлорофилла а и бактериохлорофилла а. Последний является специфическим пигментом пурпурных серных бактерий. Так же проводится регулярно наблюдение за физико-химическими параметрами водной толщи. В последние несколько лет в озере происходит изменение гидрологического режима – озеро становится все более голомиктическим. На рисунке 2 можно заметить проявления этой тенденции – озеро становится все более однородным по солености и в результате сезонного перемешивания кислород может доходить до придонных областей.

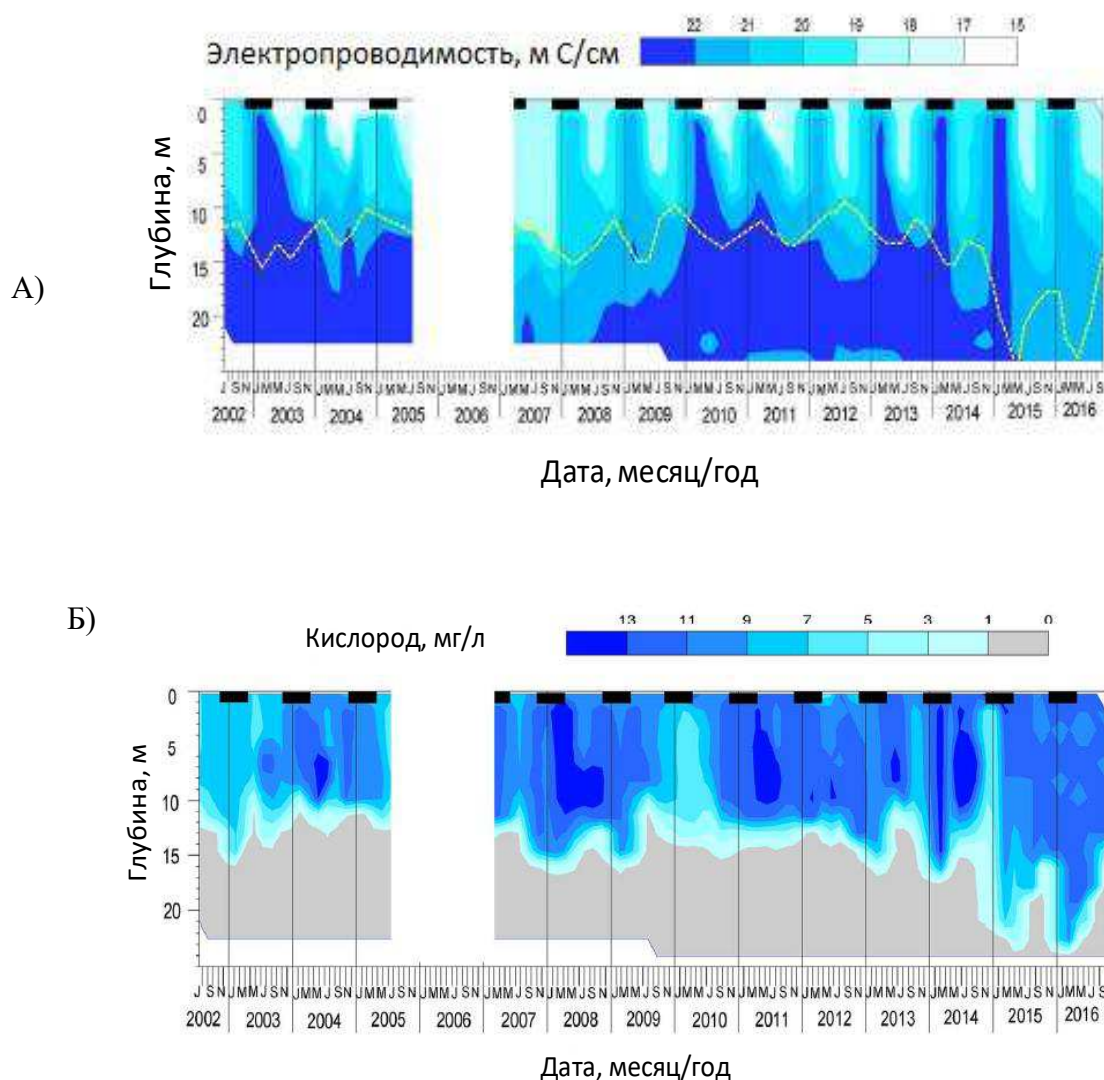


Рисунок 2 - Динамика физико-химических параметров толщ озера Шира. (Rogozin, и др., 2017), А – динамика электропроводности(солености), Б –Растворенный кислород (Rogozin, и др., 2017)

др., 2017)

Эти события отражается на аноксигенном фототрофном сообществе водоема озера. На рисунке 3 показана динамика численности пурпурных серных бактерий и ПСБ с 2007 по 2016 г.

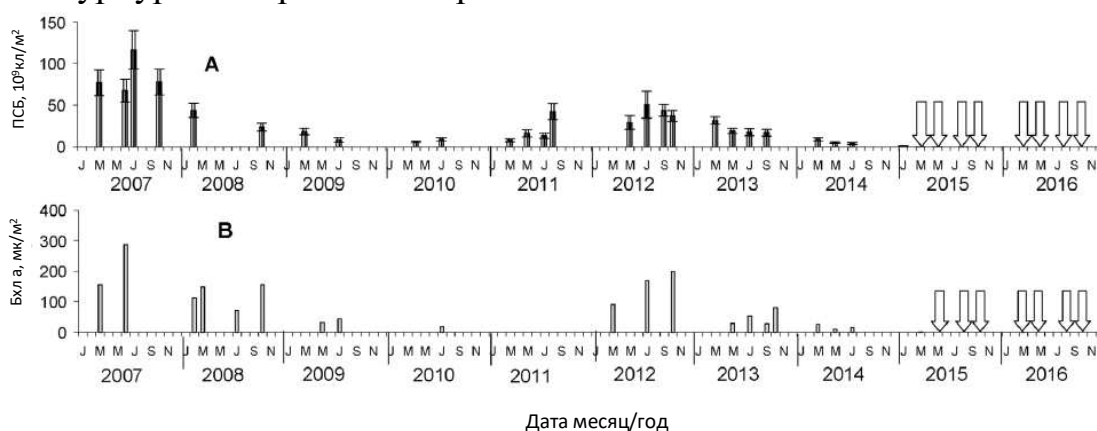


Рисунок 3 - Динамика активности пурпурных серных бактерий в водной колонне озера Шира. А) численность ПСБ, В) количество бактериохлорофилла а (Rogozin, и др., 2017)

При сопоставлении Рисунков 2 и 3 можно начавшееся в 2014 г понижение уровня редоксклина, вызвало существенное понижение количества ПСБ в толще озера. А практически полное перемешивание в 2015 и 2016 г подавило активность ПСБ до значений нерегистрируемых фотометрическим методом (Rogozin, и др., 2017).

Однако для оценки вклада ПСБ в пигменты донных отложений необходимо проанализировать пигментный состав осадочного материала.

Пигментный состав осадочного материала озера Шира

Для изучения вклада пигментов ПСБ в состав донных отложений были исследован осадочный материал, собранный в ходе экспедиций Института биофизики СО РАН.

Были получены хроматограммы пигментов экстрактов, выделенных из осадочного материала.

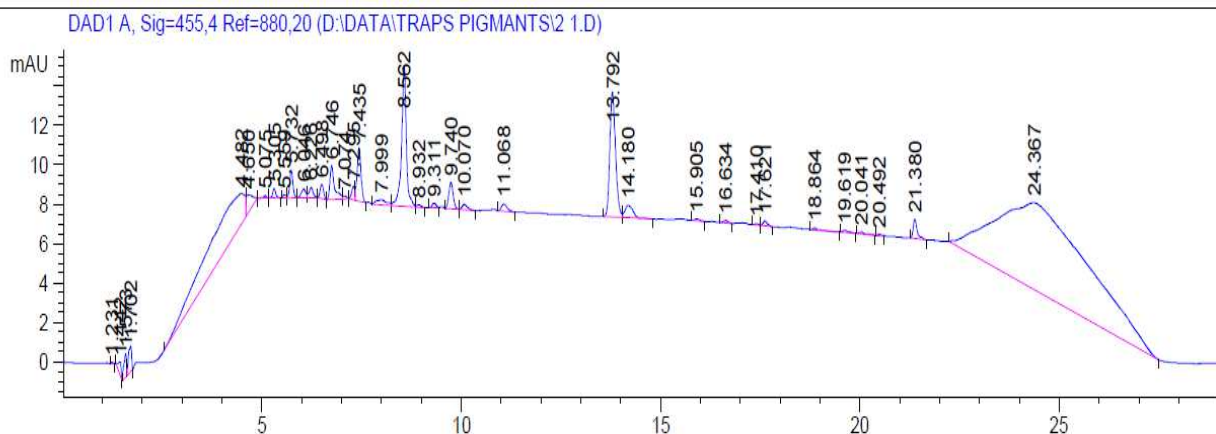


Рисунок 4 - Хроматограмма экстракта ловушки № 2 длина волны поглощения 455 нм

По времени выхода были идентифицированы основные пигменты, принадлежащие характерными для озера Шира видам из фототрофного сообщества.

Таблица 3 - Идентифицированные каротиноиды осадочного материала озера Шира

Каротиноид	Время выхода, мин	Источник в озере
Окенон	13,4 (trans) 13,8 (cis)	ПСБ
Аллоксантин	7,0	Криптофитовые
Лороксантин	7,4	Зеленые водоросли
Лютеин	7,9	Зеленые водоросли
Зеаксантин	8,1	Цианобактерии
Бета-каротин	21	Фототрофы

Наибольший интерес из пигментов представляет окенон – каротиноид специфичный для ПСБ. Далее была проведена оценка концентрации окенона в осадочном материале, результаты представлений в таблице 4.

Таблица 4 - Количество окенона в осадочном материале озера Ши́ра

Номер ловушки	Время выдержки, сутки	Концентрация окенона на сухой вес, мкг/г	Концентрация окенона в взвешенном осадочном материале, мкг/мл
-1	74	26,167	0,536
0	41	3,911	0,081
1	58	8,229	0,191
2	50	8,589	0,217
3	219	31,045	0,706
4	76	8,805	0,187
5	39	6,909	0,149
6	55	6,965	0,151
7	49	6,919	0,153
8	214	14,488	0,335
9	74	7,805	0,166
10	41	6,518	0,133
11	434	1,996	0,061
12	76	2,326	0,048
13	70	6,016	0,128
14	71	6,145	0,126
15	223	2,319	0,053
16	77	2,095	0,043
17	150	2,325	0,056
18	81	2,578	0,057
19	218		0,043
20	92	42,467	0,044
21	66	Следовые концентрации	
22	78	30,446	0,051

Для демонстрации осадконакопления окенона из данных значений были получены средние величины потока осадконакопления на единицу площади за сутки. Результат представлен на рисунке 5.

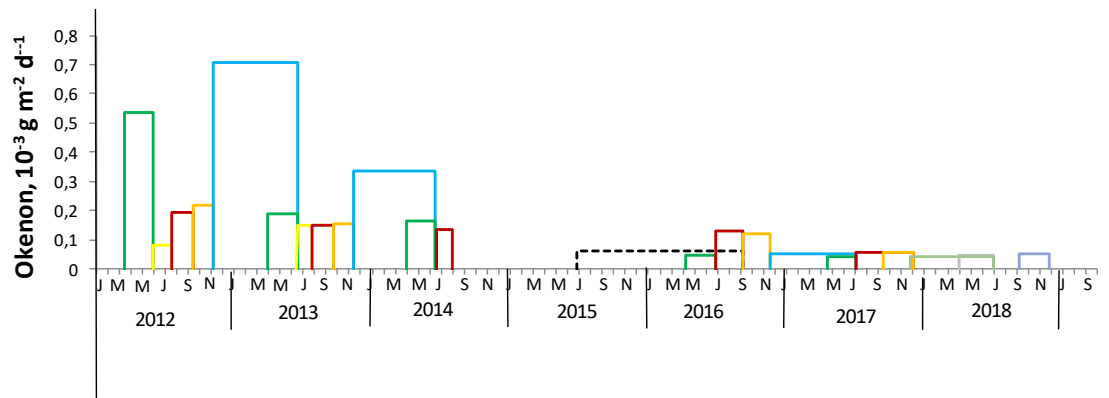


Рисунок 5 - Динамика осажения осенона в толще озера Ши́ра в период с 2012 по 2018 годы.

На основании этого графика было произведено сравнение потока осенона с иными параметрами озера Ши́ра. Результат предоставлен на рисунке 6.

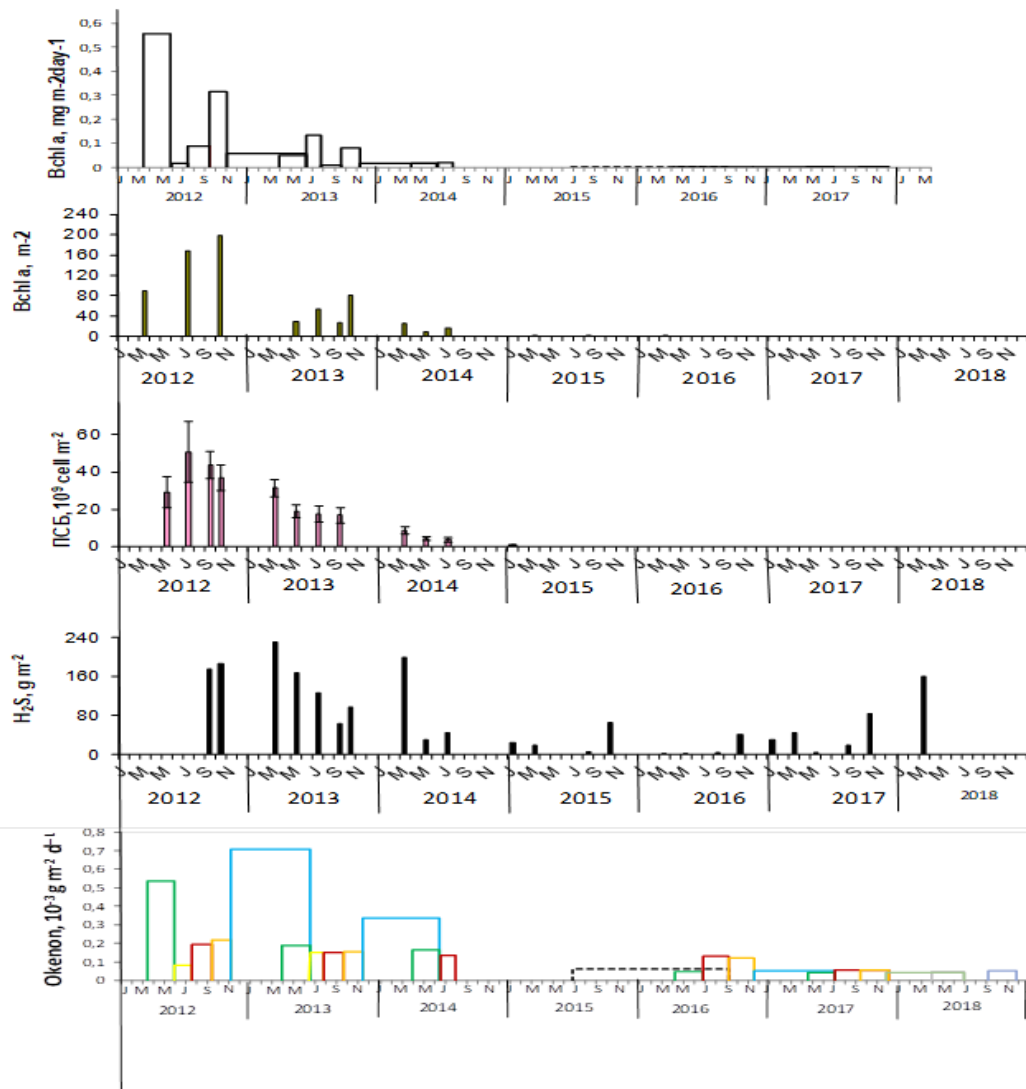


Рисунок 6 - сравнение потока осенона с иными характеристиками озера Ши́ра.

Сравнение с другими характеристиками показало, что минимальный поток окенона приходится на период, когда содержание сероводорода в озере было минимальным (вплоть до полного исчезновения) и численность пурпурных серных бактерий была ниже предела обнаружения спектрофотометрическими и микроскопическими методами. Данный период соответствует переходу озера в голомикический режим в 2015 и 2016 гг и значительному снижению содержания сероводорода. Кроме того, показано, что в период восстановления сероводорода в озере (2016-2018) начинает увеличиваться и окенон, несмотря на отсутствие пурпурных серных бактерий. Вероятно, это объясняется большей чувствительностью метода хроматографии по сравнению со спектрофотометрическим и микроскопическим методами детекции пурпурных серных бактерий.

Сравнение концентрации окенона в донных отложениях с динамикой уровня озера показано на рисунке 7.

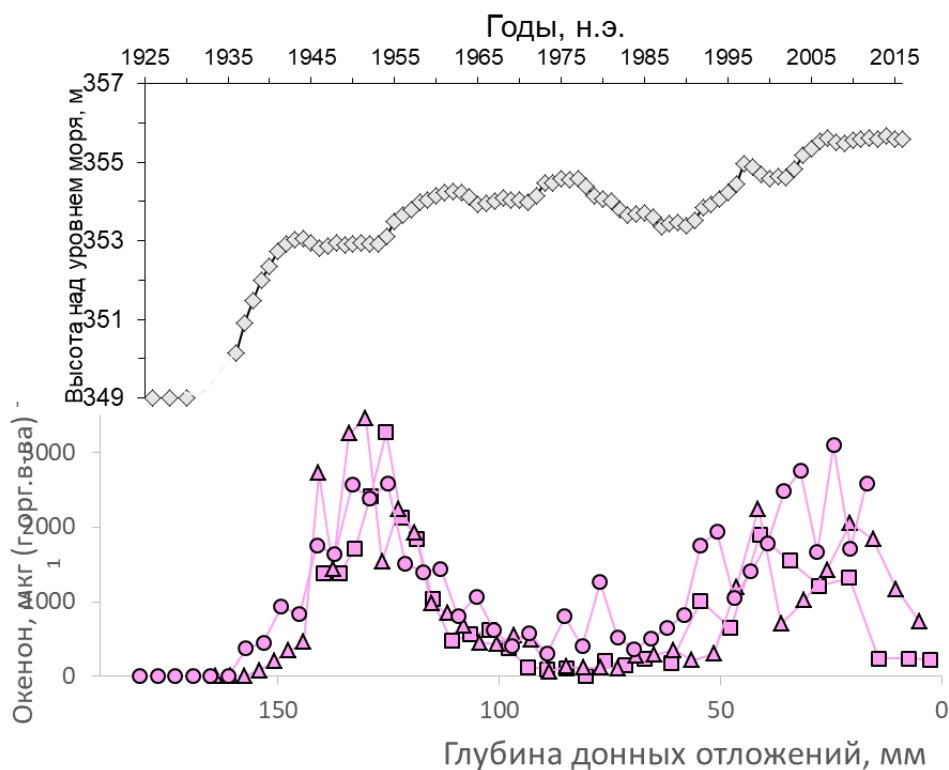


Рисунок 7 - сопоставление концентрации окенона в донных отложениях с динамикой уровня озера Ши́ра.

Сопоставление профиля окенона с динамикой уровня воды в озере показывает, что рост содержания окенона (а следовательно – увеличение численности ПСБ) приходилось на период, следующие после подъема озера (т.е. на периоды усиления стратификации), тогда как спады и низкое содержание приходятся в основном на периоды снижения уровня либо длительного постоянного уровня (ослабление стратификации).

4. Заключение

Показано, что динамика седиментационного потока окенона в донные отложения Ши́ра отражает динамику численности пурпурных серных бактерий и сероводорода, следовательно, окенон в донных отложениях может использоваться как чувствительный палео-индикатор режима стратификации озера Ши́ра.

Показано, что увеличение содержания окенона в донных отложениях происходит после резких подъемов уровня озера, что вероятно связано с усилением стратификации озера. Тем самым получено обоснование для использования окенона в качестве палео-индикатора не просто наличия сероводорода в фотической зоне водной толщи, но и динамики уровня в соленых стратифицированных озерах.

Список литературы

1. Boehrer, B., & Schultze, M. (2008). Stratification of Lakes. *Reviews of Geophysics*, 46.
2. Brown, S. J. (1991). Chlorophyll breakdown. In Scheer, H., ed. *Chlorophylls*. CRC Press. Ann Arbor, 465-489.
3. *COMPOUND: C16280*. (б.д.). Получено из KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?C16280
4. Cranwell, P. A. (1976). Decomposition of aquatic biota and sediment formation: lipid components of two blue-green algal species and the detritus resulting from microbial attack. *Freshwat. Biol.* 6, 481-488.
5. Derek Smith, J. S. (2014). Effects of Metabolism and Physiology on the Production of Okenone and Bacteriochlorophyll a in Purple Sulfur Bacteria. *Geomicrobiology Journal* , 128-137.
6. Leavitt, P. R. (1993). A review of factors that regulate carotenoid and chlorophyll deposition. *Journal of Paleolimnology*, 109-127.
7. Paerl H. W., J. T. (1984). Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms. *Limnol. Oceanogr.* , 847-857.
8. Rogozin, D. Y., Tarnovsky, M. O., Belolipetskii, V. M., Zykov, V. V., Zadereev, E. S., Tolomeev, A. P., . . . Degermindzhi, A. G. (2017). Disturbance of meromixis in saline Lake Shira (Siberia, Russia): Possible Reasons and Ecosystem respons. *Limnologica*, 66, 12-23.
9. Simpson K. L., C. O. (1981). Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.*, 351-374.
10. Swain, E. (1985). Measurement and interpretation of sedimentary pigments. *Freshwat. Biol.*, 53-75.
11. Vogl K, B. D. (2011). Elucidation of the biosynthetic pathway for Okenone in *Thiodictyon* sp. CAD16 leads to the discovery of two novel carotene ketolases. *The Journal of Biological Chemistry*, 38521-38532.
12. Горбунов, М. (2007). Вертикальная стратификация водных масс в малых озерах . *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.*, 973-986.
13. Горленко, В. М., Дубинина, Г. А., & Кузнецов, С. И. (1977). *Экология водных микроорганизмов*. М: Наука.

14. Гусев М.В., М. Л. (1992). *Микробиология*. Москва: МГУ.
15. Зыков, В. В., Рогозин, Д. Ю., Калугин, И. А., Дарьин, А. В., & Дегерменджи, А. Г. (2012). Каротиноиды в донных отложениях озера Шира как палеоиндикатор для реконструкции состояния озера (Россия, Хакасия). *Сибирский экологический журнал*, 4, 585-595.
16. Лысак, В. (2005). *Микробиология*. БГУ.
17. Мякишева, Н. (2009). *Многокритериальная классификация озер*. Санкт-Петербург: РГГМУ.
18. Нетрусов А.И., К. И. (2006). *Микробиология*. Москва: Академия.
19. Орлов В.И., А. А. (1997). *Жидкосная хроматография. Теоритические основы*. Дзержинск: Научно-технологическая компания "СИНТЕКО".
20. Сычев, К. С. (2010). *Практическое руководство по жидкостной хроматографии*. Москва: Техносфера.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологий

Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В. Крашенин Крашенин В.А.
подпись инициалы, фамилия

« 26 » июня 20 19 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

03.03.02 – Биохимическая физика

Каротиноид окенон как палео-индикатор режима циркуляции и динамики
уровня озера Шира.

Руководитель

Рогозин 26.06.19
подпись, дата

проф., д.б.н.
должность, ученая степень

Д. Ю. Рогозин

Студент

Киященко 26.06.19
подпись, дата

Н.А. Киященко

Красноярск 2019